

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 31/426

(45) 공고일자 2004년11월03일
(11) 등록번호 10-0454767
(24) 등록일자 2004년10월20일

(21) 출원번호 10-2001-0043490
(22) 출원일자 2001년07월19일

(65) 공개번호 10-2003-0008654
(43) 공개일자 2003년01월29일

(73) 등허권자
동화약품공업주식회사
서울 중구 순화동 5번지

서홍석
부산광역시 금정구 부곡동 244-7 부곡대우아파트 112-502

(72) 발명자
이진수
경기도 용인시 수지읍 풍덕천 693 삼성 1차 아파트 105-1306

김관수
경기도 안양시 동안구 비산동 판암성 원아파트 303동 1007호

황연하
경기도 안산시 월피동 447번지 한양아파트 4동 102호

유제만
경기도 안양시 동안구 부흥동 1103 은하수아파트 207-101

정용호
경기도 안양시 동안구 호계동 샘마을아파트 301-204

서홍석
부산광역시 금정구 부곡동 244-7 부곡대우아파트 112-502

김은주
대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 106동 1002호

김도희
경기도 성남시 수정구 단대동 93-11

박용업
부산광역시 금정구 부곡 1동 313-31

(74) 대리인
이병현

설사관 : 한선희

(54) 4-[4-티아졸릴]페녹시]알록시-벤즈아미딘 유도체의 골다공증 예방 및 치료제로서의 용도

본 발명은 류코트리엔- B_4 (Leukotriene- B_4 ; 이하 LTB-4로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 하기 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-펜톡시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-펜톡시]-벤즈아미딘의 굴다공증의 예방 및 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.
색인

굴다공증, 골 흡수, 류코트리엔- B_4 , 파골세포

명세서

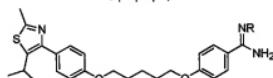
발명의 상세한 설명

발명의 녹적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-티아졸릴)-페녹시]-알록시-벤즈아미딘 유도체를 함유한 굴다공증 예방 및 치료용 약제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 류코트리엔- B_4 (Leukotriene- B_4 ; 이하 LTB-4로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 하기 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-펜톡시]-벤즈아미딘(이하 DW1352라 한다) 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-펜톡시]-벤즈아미딘(이하 DW1350이라 한다)의 굴다공증의 예방 및 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

화학식 1



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

골(骨)은 신체의 물리적 저지제로서 필요한 골량과 구조를 보존하는 역할을 하며, 칼슘(Ca^{2+}) 등의 보관고로서 칼슘 등의 혈중 농도 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 기능을 수행하기 위한 필요한 대용으로서 골은 항상 분해작용과 재구축(remodelling)을 조정하여 이행한다. 따라서 골은 골 흡수와 골 형성의 양자가 활발하게 전행되어, 대사적인 면에서 국에 이르는 동적인 상태이다. 이 골 흡수와 골 형성간의 평형 관계가 파괴되면 골 흡수가 골 형성에 상대적으로 상회하게 되어 골밀도 또는 골량의 감소를 야기시켜 골강도가 유지되지 못하는 상태인 굴다공증이 나타날 수 있는데, 이는 중-노년층의 여성에 특히 많이 나타나는 질환이다.

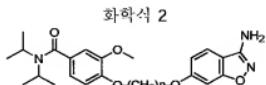
파골세포의 기능을 저해하여 과다한 골 흡수를 억제함으로써 굴다공증에 효과가 있는 치료제가 개발되어 왔으나 그 동안 LTB-4의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 물질들은 골 흡수의 억제효과가 미흡하여 굴다공증치료제로서 개발되지 못하였다. 따라서 골 흡수를 효과적으로 억제하는 약제의 개발이 필요하다.

한편 4-[5-(4-티아졸릴)-페녹시]-알록시-벤즈아미딘 유도체는 류코트리엔- B_4 (Leukotriene- B_4 ; 이하 LTB-4로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 이미 공지된 물질이며 그의 제조방법도 함께 공지되어 있다(이성은, *Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB₄ Related Disease*, 부산대학교 대학원 이학박사 학위논문, 1999. 8)

천연물인 LTB-4는 5-리폭시제네이즈 경로에 의해 형성되는 아라키도네이트의 대사 물질 중의 하나인데 [Ford-Hutchinson, A.W. et al., *Nature*, (London), 286, 264-265, 1980], 최근에는 아라키도네이트의 대사산물들이 골조직 대사에 미치는 영향에 대한 연구가 전개되어 왔다. 조골세포에서 5-리폭시제네이즈 대사산물이 생성되며, 이들에 의해 골 흡수가 촉진되며(Meghji, S. et. al., *Calcif. Tiss. Int.* 36, 139-149, 1988), 거대세포종(giant cell tumor)에서 얹어진 간질세포인 C433세포가 5-리폭시제네이즈 대사산물들을 생성하여 파골세포수를 증가시키고 활성을 촉진시

키머(Mundy, G. R., *J. Bio. Chem.* 268, 10087-10094, 1993), 골조직 배양시 synthetic LTB-4를 첨가하면 골흡수率가 촉진되고(Bonewald, L.F., *J. Bone Miner. Res.* 11, 521-529, 1996), LTB-4도 *in vitro*, *in vivo* 모두에서 골세포 성장을 통하여 골 흡수를 일으킨다(Bonewald, L.F., *J. Bone Miner. Res.* 11, 1619-1627, 1996)고 각기 보고된 바 있다. 따라서 LTB-4 수용체에 대하여 길항작용을 나타내는 화합물은 골 조직 대사질환에 영향을 줄 것으로 보고 현재 이들에 대해 다각적인 연구가 지속 중에 있다.

이에, 본 발명자들은 다양한 구조의 화합물들을 합성하여 LTB-4 수용체에 대하여 길항제로서의 효능 또는 글 흡수 억제 및 글 형성 촉진 효과를 확인하는 작업을 해왔으며, 이들 중에서 아래 화학식 2의 3-아미노-1,2-벤조이소옥사졸 유도체가 LTB-4 수용체에 대하여 길항작용을 나타낸다 동시에 글다공증의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다. 이들에 대하여는 1998년 2월 4일자 출원 제 98-003138호로 특허출원을 하여 있다.



상기 식에서 η 은 3~5의 정수이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

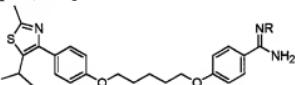
본 발명자들은 계속하여 골다공증에 대한 효과적인 치료를 목적으로, LTB-4 수용체의 길항작용을 갖는 4-[(4-티아졸릴)페녹시]알록시-벤즈아미딘 유도체에 대하여 골흡수 억제 효과를 확인하는 작업을 해왔으며, 이를 중에서 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜토시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜토시]-벤즈아미딘 화합물이 골파세포의 기능을 증진시킬 수 있는 것으로 확인되었고, 그 효능은 특히 골흡수 억제작용에 있어 훨씬 더 우수한 것으로 확인되었으며, 이전까지 알려진 것과는 달리 골흡수 억제작용은 골성장인자와는 상관없이 골성장인자에 영향을 미치지 않았다.

효과적으로 세탁하여 꽂은 후 세제에 담그거나 효과가 있는 경우 그 담장을 청정하게 해 버려요. 따라서, 별 명령의 목적은 화학식 1로 표시되는 4-[5-(4-[5-(이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-펜-아미드] 또는 N-히드록시-4-[5-(4-[5-(이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-펜-아미드는 그의 영역을 유한 험으로 험유하는 꽂은 꽂은 치료제를 제조하는 것이다.

발명의 고선 및 장용

본 발명은 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜록시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜록시]-벤즈아미딘의 글다공증 예방 및 치료제로서의 유통에 관한 것이다.

8. 뜻 대조 [학습 1]



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

4-[(4-티아졸릴)-페녹시]-벤조아미드 유도체는 공지된 방법(이성은, *Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB₄ Related Disease*, 부산대학교 대학원 이학박사 학위논문, 1999, 8)에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 상기 학회식 1 화합물은 약세학적으로 허용되는 염으로 사용될 수도 있는데 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등이, 유기산으로는 구연산, 초산, 췌산, 주석산, 푸마르산, 포토산, 르포이온산, 유탈산, 트리플루오로아이세트산, 메탄설론산, 말테인산벤조산, 글루코산, 글리코산, 속신산, 4-톨루엔솔포산, 갈록투로운산, 엔분산, 글루탐산 또는 이스아프트로산등이 사용될 수 있으며, 바람직한 기호로는 무기산으로는 염산이 유기산으로는 메탄설론산이 사용될 수 있다.

본 발명의 골다공증 치료제는 각종의 투여 경로를 통하여 골다공증을 치료하는데 유효한 양으로 투여될 수 있으며, 그의 세제, 투여량 등은 투여목적, 투여경로 및 투여대상의 상태 및 제제 등을 고려하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

분 발명의 골다공증 치료제 조성물은 화학식 1로 표시되는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-페녹시]-페녹시]-벤즈아미드 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-페녹시]-벤즈아미드와 약제학적으로 허용되는 담체를 함유한다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 멀균용액, 경제, 고정경 및 퀘스풀과 같은 공기 제거등에 사용되는 표준의 제약학적 담체 중 어느 것인가 포함된다. 전형적으로 이러한 담체는 전분, 밀크, 당, 특정 종류의 클레이, 켐라린, 스테아린산, 탈크, 쇠물성 기름 또는 오일, 겔, 글리콜류 등의 부형제, 또는 기타 다른 공기의 부형제를 포함한다. 이러한 담체에는 또한 풀지메시, 색소 첨가제 및 다른 성분들이 포함될 수 있다.

본 발명은 있어서 4-[5-(4-[5-(이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-벤록시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-(4-[5-(이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-벤록시]-벤즈아미디온으로 하우저거나 간기 그의衍物을 포함하는 담체를 함유하는 조성물을 주제된 방법에 의해 제조하는 방법이다.

활용하는 골다공증 치료제는 공지된 방법, 예를 들면 경구, 정맥내, 근육내, 경피투여 등의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 이를 방법에만 한정되는 것은 아니다.

골다공증의 예방 및 치료효과를 기대하기 위한 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]벤톡시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]벤톡시]-벤즈아미딘의 투여량은 매우 광범위하다. 골다공증 치료제로서의 유효한 양은 1일에 10~1000mg이다. 투여량 및 투여횟수는 제제의 특성, 투여대상의 체중 및 상태, 염증의 크기, 투여경로에 따라 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

다음의 실시 예는 본 발명을 더욱 자세히 설명하여 준다.

[실시 예 11] 과골세포의 분화억제 효과

각 실험물질이 과골세포의 형성과 분화과정에 미치는 영향을 조골세포와의 공존배양을 통해 평가하였다.

1. 세포의 준비

가. 골수세포의 준비

6-8주령 원수컷 ddY 마우스로부터 무균적으로 경골을 적출하고 적출한 경골로부터 주사기(21G, 녹십자)를 이용하여 골수세포를 회수하여 α -MEM 배지(Gibco BRL사, 탄산수소나트륨 2.0g/L, 스트렙토마이신 100mg/L, 페니실린 100000unit/mL)을 참가한 후 여과(밀균함) 5mL에 골수세포를 혼탁하여 모아 800 x g에서 5분간 원심분리하여 수거하였다. 골수세포내의 적혈구를 제거하기 위해 Tris HCl(0.83% NH₄Cl, pH7.5) 3mL을 참가하여 잘 혼든 후, 원심분리를 통해 회수한 골수세포의 유액 세포수를 확인하고, 공존배양을 위해 바로 사용하였다.

나. 골아세포의 준비

1-2일령 원신생 ICR 마우스로부터 전구골과 두정골을 무균적으로 적출하여 PBS 용액으로 씻어 준 후, 혼합효소용액(0.2% 폴리케이노스와 0.1% 디스파제)에 연속적으로 6-7회(10, 10, 10, 20, 20, 20분) 처리하고 조골세포의 특성을 지닌 세포들이 많이 존재하는 3-6회군의 세포를 집중적으로 수집하여 배양액(serum free α -MEM)으로 세척하였다. 세척된 세포들을 10% FBS가 포함된 α -MEM에서 2-3일 정도 배양한 후 1차 세대 배양하여 모든 세포들을 실험에 사용하였고, 회수한 세포들을 1×10^6 cell/mL의 농도가 되도록 회석하여 -70°C에서 보관하였다.

2. 과골세포의 분화정도의 측정

가. 시료의 준비

본 발명의 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]벤톡시]-벤즈아미딘(DW1350) 및 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]벤톡시]-벤즈아미딘(DW1352)과 대조군으로 사용되는 LTB-4 수용체 길항제인 N,N-디이소프로필-4-[4-(3-아미노이미노벤조[*d*]이소옥사졸-6-일옥시)부록시]-3-메톡시벤즈아미드(이하 HS-1141 이라 한다) 및 4-[5-[4-(아미노이미노메틸)페녹시]벤톡시]-3-메톡시-N,N-비스(1-메틸에틸)벤즈아미드(말린에이션(Morrissey, M. M., Suh, H. 미국특허 제 4,541,700호, 이하 CGS-25019C라 한다)은 모두 멀균증류수에 용해하여 각 원하는 농도로 회석하였고, 세포배양액에 들어가는 최종 시료의 부피는 1:1000으로 하였다.

나. 공존배양을 통한 시료와의 반응

과골세포의 분화를 위해 상기 1번 항에서 준비한 골수세포와 골아세포를 공존배양하였다. 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지를 사용하여 96 well plate에 골수세포(25,000 cells/cm²)와 골아세포(10,000 cells/cm²)를 분주하여 넋은 후, 실험하고자 하는 시료들을 넣어 7일간 배양하였다. 배양 동안 맥사메타손(10^{-6} M)과 비타민 D3(10^{-9} M)과 같은 분화인자를 배양 첫날부터 복합 투여하였으며, 2-3일간마다 상기 시료와 분화인자가 혼합된 새로운 배지로 교환하였다.

다. 과골세포의 분화정도의 평가

1) TRAP(Tartric Acid Resistance Alkaline Phosphatase)염색액의 조제

TRAP 염색액에 양성반응을 가진 과골세포의 특성을 이용하여 성숙한 과골세포를 측정하는 마커(marker)로서 TRAP를 이용하였다. TRAP염색액의 조제는 기질 Naphthol AS-MS 포스페이트(sigma N-4875) 5mg 및 색소(Fast Red Violet LB salt) 25mg을 N,N-디메틸포름아마이드(약 0.5mL)에 녹였다. 50mM 타르타르산을 포함한 0.1N NaHCO₃ 완충액 50mL을 참가한 후 냉장보관하며 염색액으로 이용하였다.

2) 염색법

7일간 배양한 세포로부터 배양액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후 10% 포르말린을 포함한 PBS에 세포를 2-5분간 고정하였다. 에탄올과 아세톤의 혼합액(1/1)에 약 1분간 세척 고정한 후 건조하였다. TRAP 염색액을 15분간 처리 후 수세진조하고 현미경하에서 염색 여부를 판단하여 그 결과를 판정하였다.

3) 결과의 판정

현미경하에서 TRAP-양성반응을 보이며 3개 이상의 핵을 가진 과골세포만을 관찰하여 그 수를 세었으며 각 실험군에 대해 3회 이상의 반복시험을 실시하였다.

결과는 대조군에 대한 각 실험군의 성숙과골세포 분화억제정도를 %값으로 표시하였으며, 50% 과골세포분화억제를 보이는 농도를 IC₅₀으로 산정하여 하기 표 1에 나타내었다. 종래의 LTB-4 수용체에 대한 길항작용을 가진 공지의 CGS-25019C와 같은 용도의 약물로서 본 발명자들에 의해 골다공증치료제로 공지된 HS-1141(미국 특허등록 제6150390호, 한국 특허출원 제98-3138호)을 대조군으로 사용하여 약효를 비교 및 평가하였다.

[표 1]

시료	% 저해정도				
	3.2nM	16nM	80nM	400nM	IC ₅₀

DW1350	1.0	68.8	82.3	88.0	19.87nM
DW1352	50.0	81.8	83.9	92.7	1.25nM
HS-1141	1.2	3.0	12.0	23.5	-
CGS-25019C	-8.9	8.3	0.0	17.7	-

상기 표 1에 나타낸 결과와 같이 본 발명의 DW1350과 DW1352는 HS-1141 및 CGS-25019C에 비해 파골세포의 분화 및 형성과정에 대한 탁월한 억제능력을 가지고 있음을 알 수 있다. 매우 낮은 농도에서도 성숙한 파골세포로의 분화과정에 영향을 미치는 본 약물들의 특성은 골다공증 치료 및 예방을 위해 유리한 조건을 가지고 있는 것으로 평가된다.

[실시 예 2] Fusion assay

아직 성숙하지 않은 미용합 파골세포(prefusion osteoclasts(pOC), 한개 또는 두개의 핵을 가진 파골세포로 구성)들이 각 세포간의 융합을 통해 성숙한 파골세포(multinucleated osteoclast(OC))로 전환하여 분화하는 과정 중, 각 세포질들이 미치는 영향을 파골세포의 융합정도로 평가하는 분석법이다.(Gregg Wesolowski et al. Experimental Cell Research 219, 679-686, 1995)

1. 미용합 파골세포(pOC)의 준비

미용합 파골세포는 상기 실시 예 1에서 준비한 골수세포와 골아세포의 공존배양을 통해 얻을 수 있다. 100mm 배양접시에 골아세포(약 5 × 10⁵ cell/plate)와 골수세포(약 1 × 10⁷ cells/plate)를 혼합하여 접종하였다. 메사메타손(10⁻⁶ M)과 비타민 D3(10⁻⁹ M)의 분화인자를 배양 첫날부터 복합 투여하였으며, 2일간마다 분화인자가 포함된 새로운 배지로 교환하였다. 약 1개 또는 2개 정도의 파골세포가 융합된 상태인 미용합 파골세포는 공존배양 4일 정도에서 많이 형성되므로 4일째에 세포를 분리하여 이용하였다. 배양액을 제거하고 0.2% 풀라제네즈 용액을 4mL 첨가한 후, 37°C에서 20분간 배양하여 부착세포를 분리하였다. 이때 분리된 대부분의 세포들은 조절세포로서 PBS 용액으로 2-3차례 씻어 남아있는 조절세포를 모두 제거하였다. 에치스탈린(echistatin containing 10% BSA)을 넣어 20분간 반응시키면 남아있는 대부분의 미용합 파골세포들이 분리되므로 이들을 모아 원심분리에 의해 세포를 회수하였다.

2. 융합실험의 반응

각 농도별로 회석한 실험물질을 α -MEM 배지(10% FBS 첨가)에 원하는 농도로 회석하여 잘 섞은 후, 96 well microplate에 100uL/well로 첨가하였다. 상기 1번 항에서 분리한 파골세포형 단핵세포를 5 × 10³ cell/100uL/well로 첨가하고, 24시간 동안 37°C에서 배양하며 파골세포의 융합이 이루어지도록 하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조군과 양성대조군에 대해서도 동일한 조건으로 실험을 수행하였다. 양성대조군으로는 HS-1141과 CGS-25019C뿐만 아니라 DW1350과 DW1352와 유사 화학구조를 가지고 있는 4-[4-(4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]부록시]-벤즈아미딘(이하 DW1351이라 한다) 및 N-하이드록시-4-[4-(4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]부록시]-벤즈아미딘(이하 DW1349라 한다) 등도 사용하였다.

3. 파골세포의 융합정도의 측정 및 분석

세포를 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 1회 세척하여 10% 포르밀린을 포함한 PBS용액에 세포를 약 5분간 고정하였다. 에탄올/아세톤(1/1)에 약 5분간 채자 고정한 후 건조하였다. TRAP 염색액을 15분간 처리 후 수세 건조하여 현미경하에서 관찰하였다. 융합에 의해 단핵세포에서 다핵세포(10개 이상의 핵을 가진 파골세포)로 분화된 TRAP 양성파골세포수를 측정하였다. 결과는 측정된 세포수를 대조군과 비교하여 보인 차이를 % 억제농도로 하여 표 2로 나타내었다.

[표 2]

시료	억제 정도(%)				IC ₅₀
	0.08uM	0.4uM	2uM	10uM	
DW1350	4.50	25.64	80.00	97.95	0.81uM
DW1352	5.13	24.72	87.18	98.97	0.74uM
HS-1141	2.1	12.31	15.71	36.29	-
CGS-25019C	10.14	13.04	13.77	12.32	-
DW1351	0.0	0.0	38	74	-
DW1349	0.0	2.3	4.5	18	-

상기 표 2의 결과에서 보듯이 DW1350과 DW1352는 파골세포의 융합과정에 탁월한 저해효과(IC₅₀ : 각각 0.81과 0.74uM)를 보였다. 즉, DW1350과 DW1352의 융합억제효과로 인하여 융합에 의해 형성되는 성숙파골세포가 만들

어지는 과정이 저해를 받아 파골세포의 골 흡수 기능이 탁월하게 억제된다. 대조약물로 쓰인 공자의 CGS-25019C는 약물농도에 상관없이 파골세포의 융합저해효과가 거의 보이지 않았고, HS-1141은 약물농도의 의존성이 보이나, D W1350과 DW1352보다 낮은 억제능력을 보여주었다. 특히 DW1350 및 DW1352와 화학구조적으로 극히 유사한 D W1349 및 DW1351도 역시 HS-1141과 같이 약물농도의 의존성이 보이나, DW1350 및 DW1352보다 현저히 낮은 억제능력을 보였다.

따라서 4-[4-(티아졸릴)페녹시]-벤즈아미딘 유도체 중에서도 DW1350과 DW1352는 융합과정의 저해를 통해 성숙한 파골세포로의 형성을 효과적으로 차단시킴으로써 새로운 골다공증 치료제로 개발될 수 있을 것이다.

[실시 예 3] 골 흡수능의 측정(pit formation assay)

성숙한 파골세포(OCL)의 주 기능은 뼈의 흡수를 통해 뼈를 분해시키는 활성을 가진다. 본 실험은 상아절편 상에서 파골세포의 골 흡수 능력을 저해하는 각 실험물질들의 억제효과를 알아보는 평가법이다.(Eijiyo Jimi et al. Endocrinology 137, p2187-2190, 1996)

1. 성숙한 파골세포의 준비

가. 콜라겐 젤 용액의 조제

콜라겐 젤(cell matrix Type I-A) 배양접시를 이용하여 공존배양을 수행하였다. 이들의 조성은 콜라겐, 5배 농축된 α -MEM 배지, 0.05M NaOH 완충액(2.2% NaHCO₃, pH7.4)을 각각 7:2:1의 비율로 저온에서 혼합하여 저온보관하고, 100mm 배양접시에 4mL의 용액을 첨가 후 고루 도포하고 37°C에서 5분간 방치하였다.

나. 공존배양에 의한 성숙한 파골세포의 준비

α -MEM 배지 사용하여 상기 실시 예 1에서 분리한 골수세포와 끌아세포를 각각 콜라겐 젤에 도포된 100mm 배양 접시에 끌아세포(약 5×10^5 cell/plate)와 골수세포(약 1×10^7 cells/plate)를 혼합하여 접종하였다. 비타민 D(10⁻⁹ M)과 메사메타손(10⁻⁶ M)과 같은 분화인자의 존재 하에서 공존배양 하였다. 골 흡수 활성을 가진 담액의 성숙한 파골세포는 위에서 서술한 방법처럼 7일간의 공존배양을 통해 다양한 파골세포를 확보하였다. 배양액을 제거한 후 0.2% 를라게나이제를 20분간 처리하여 세포를 분리시킨 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 crude 파골세포로서 다시 α -MEM 배지에 희석하여 5,000 cells/100ul가 되도록 세포를 준비하였다.

2. 헤마톡실린(hematoxyllin) 염색액의 조제

헤마톡실린 1g을 정제수 500ml에 녹인 후 정제수 500ml과 요오드산나트륨 0.2g을 가하고 15분간 교반하였다. 암모니움 명반 50g과 아세트산(빙조산) 7.5ml를 가하고 충분히 교반한 후 여과하여 염색액으로 사용하였다.

3. 상아절편상에서의 반응

1mm 두께로 절단된 상아절편을 멀균하여 96 well plate에 하나씩 넣고, α -MEM 배지(10% FBS) 100ul를 첨가하였다. 파골세포의 pit 형성 저해활성을 측정하기 위해 실험 물질들은 농도별로 최고 3ul의 양으로 넣었다. 시료첨가 후 준비된 파골세포용액을 100ul 넣고, 잘 혼들어서 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양하였다. 상아절편에 형성된 pit의 관찰하기 위하여 파골세포가 성장한 부분을 위로 향하게 하여 96 well plate로부터 꺼내 종이타ulle에 옮겨놓고 상아 위의 세포를 제거한 후, 헤마톡신용액 10ul를 상아 위에 떨어뜨려 약 5분 정도 염색을 실시하였다. 염색액을 제거하고 상아절편 표면을 부드러운 펜봉으로 문질러 염색액을 완전히 제거하였다.

4. 생성된 pit의 관찰과 분석

현미경상으로 상아절편에 생성된 pit의 수를 측정하여 대조군과 비교하여 보인 차이를 % 억제 활성정도로 나타내었다.

[표 3]

시료	억제 정도(%)					IC ₅₀
	0.016uM	0.08uM	0.4uM	2uM	10uM	
DW1350	32.2	53.9	65.2	84.3	91.3	0.075uM
DW1352	25.0	48.7	61.3	81.7	90.0	0.131uM
HS-1141	9	33	50.4	75.3	88.7	0.421uM
CGS-25019C	0	0	2	9.2	17.3	-

상기 표 3에 나타낸 바와 같이 DW1350과 DW1352는 파골세포의 주 기능인 골 흡수기능에 대해 탁월한 억제 능력을 보여 주고 있다. DW1350은 0.075uM, DW1352는 0.131uM의 IC₅₀ 값을 가져 HS-1141보다 3~6배 정도의 더 우수한 골흡수 억제능력을 지니고 있음을 상기 실험을 통해 관찰되었다. 그러나 양성대조군인 CGS-25019C는 본 실험에 대해 아주 낮은 골 흡수 저해기능을 갖고 있음을 알 수 있었다.

[실시 예 4] 조골세포 활성 측정을 위한 ALP 활성 평가

조골세포의 뼈의 형성과 밀접한 관계를 갖고 있는 ALP(Alpkaline Phosphatase)의 활성을 측정하여 조골세포의 분화 및 활성의 정도를 평가하는 실험이다.(Y. Wada et al., Bone, 22, 479-485, 1998).

조골세포에서 유래된 MC3T3-E1 세포를 well당 3,000 cells/96 well plate에 배양하여 24시간이 경과한 후에 분화인자인 아스코르브산(100ug/ml)과 5mM β -글리세로인산이 첨가된 새로운 배지로 교환하였다. 이때, 실험약물을 같이 처리하였으며, 새로운 배지로의 교환은 매 3일마다 반복한다. 2주 후에 ALP의 활성을 측정하고자 배양을 중지

하고, 상등액을 제거한다. 0.5% Triton X-100을 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 50ul을 꺼내 여기에 p-니트로페닐포스페이트(1.21mM)를 100ul 첨가한다. 37°C에서 30분간 반응시키고, 0.2N 수산화나트륨을 50ul 첨가하여 반응을 정지시킨다. 표준물질로 p-니트로페놀을 사용하여 405nm의 흡광도에서 표준곡선을 그린 후, 반응한 실험물질의 흡광도를 측정하여 생성된 p-니트로페놀의 양을 측정하였다.

ALP 활성의 단위표시는 각 실험물질의 단백질량을 측정한 후 시간(분당 혹은 시간당)당 1ug의 단백질 당 생성하는 p-니트로페놀(nM)의 양으로 결정하였고 그 결과를 아래 표 4에 나타내었다.

[표 4]

시료 (10 ⁻⁸ M)	ALP 활성 (Units)
DW1350	19.8
DW1352	17.1
HS-1141	15.2
CGS-25019C	15.0
대조군	13.5

상기 결과와 같이 DW1350은 대조군을 포함한 모든 실험군에 비해 가장 높은 수치의 ALP 활성을 보였다. DW1352도 대조군 및 HS-1141과 CGS-25019C에 비해 월등한 실험 결과를 나타내었다. 본 실험을 통해 DW1350 및 DW1352는 조글세포의 분화 및 형성에 밀접한 영향을 끼쳐 조글세포의 활성을 증가시키는 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이에 DW1350과 DW1352는 파글세포의 억제능력 뿐만 아니라 조글세포의 활성능력을 갖춘 골다공증 예방 및 치료제로서의 역할을 수행하는데 여러 가지 장점을 지니고 있다.

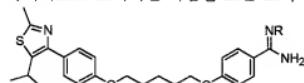
발명의 효과

상기 한 실시 예의 결과로부터, LTB-4 수용체의 길항제로 작용하는 본 발명의 DW1350과 DW1352는 파글세포의 분화, 형성, 용합과정 및 골 흡수 기능에서 우수한 저해효과를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 이는 같은 용도의 약물로 개발된 HS-1141과 CGS-25019C뿐만 아니라 구조적 유사성이 있는 DW1349 및 DW1351보다도 파글세포에서의 억제기능이 훨씬 뛰어나고 또한 조글세포의 활성을 증가시키는 효능을 가지고 있으므로 골다공증 예방 및 치료제의 용도로 적합한 물질임이 판명되었다. 따라서 본 발명의 화합물은 LTB-4와 관련된 각종 질병뿐만 아니라 특히 효과적인 파글세포 억제능력과 동시에 조글세포 활성능력을 갖춘으로서 새로운 작용기전을 가진 우수한 골다공증의 예방 및 치료효과를 기대 할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기식으로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

청구항 2.

제 1항에 있어서, N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-벤즈아미딘 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제

청구항 3.

제 1항에 있어서, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]-벤즈아미딘 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제